

Марков Павел Александрович

**СВЯЗЬ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ПЕКТИНОВ С ИХ
СТРУКТУРОЙ**

03.00.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Сыктывкар - 2009

Работа выполнена в УРАН Институт физиологии Коми НЦ УрО РАН, г. Сыктывкар.

Научный руководитель: кандидат биологических наук,
доцент Попов Сергей Владимирович.

Научный консультант: академик РАН Оводов Юрий Семенович

Официальные оппоненты: доктор химических наук, профессор
Офицеров Евгений Николаевич

доктор биологических наук, профессор
Чиков Владимир Иванович

Ведущая организация: УРАН Институт физиологии и иммунологии
УрО РАН, г. Екатеринбург.

Защита состоится 26 марта 2009 г. в 13.00 на заседании диссертационного Совета Д
212.081.08. при Казанском государственном университете по адресу: 420008, г.Казань, ул.
Кремлевская, д.18

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке им. Н.И.Лобачевского
Казанского государственного университета

Автореферат разослан «20» февраля 2009 г.

Ученый секретарь

диссертационного Совета

доктор биологических наук, профессор



З.И.Абрамова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ. Установлено, что пектины ингибируют развитие воспаления стенки кишки у экспериментальных животных, при этом противовоспалительное действие пектинов сопровождается уменьшением количества кишечных лейкоцитов (Rolandelli *et al.*, 1988; Liu *et al.*, 2003; Lim *et al.*, 2003).

Ранее показано, что пектины способны не только подавлять, но и стимулировать активность лейкоцитов. Так, например, лемнан LM, пектин из ряски малой *Lemna minor* L., и силенан SV, пектин из смолевки обыкновенной *Silene vulgaris* L., стимулируют функциональную активность лейкоцитов и оказывают противовоспалительное действие (Попов, 2002, Porov *et al.*, 2006). В то же время комаруман CP, пектин из сабельника болотного *Comarum palustre* L., и потамогетонан PN, пектин из рдеста плавающего *Potamogeton natans* L., обладают противовоспалительным действием (Porov *et al.*, 2005, 2007). Приведенные примеры говорят о том, что реакция иммунной системы млекопитающих на пектины зависит от особенностей строения полисахаридов.

Исследования противовоспалительного действия пектинов при повреждении кишечной стенки проводятся с использованием коммерческих пектинов, главным образом, цитрусового и яблочного (Koruda *et al.* 1986; Rolandelli *et al.*, 1988; Mao *et al.*, 1996), при этом не учитывается структурное разнообразие пектинов, встречающихся в природе.

Макромолекула пектинов представляет собой сложный гетерополисахарид, содержащий линейные области α -D-галактуронана и разветвленные области, в состав которых, наряду с галактуроновой кислотой, входят остатки нейтральных моносахаридов (BeMiller, 1986; O'Neill *et al.*, 1990).

В основе макромолекулы всех пектиновых полисахаридов лежит линейная цепь из 1,4-связанных остатков α -D-галактопиранозилуроновой кислоты, образующих фрагменты линейного галактуронана (Schols, Voragen, 1996). Отдельные участки галактуронана связаны между собой остатками α -L-рамнопиранозы и образуют линейный рамногалактуронан, при этом на один остаток рамнозы может приходиться от 25 до 200 остатков α -D-галактурононовой кислоты (Powell *et al.*, 1982; Thibault *et al.*, 1993).

Разветвленная область макромолекулы пектинов образована гетерогликаногалактуронанами: чаще всего рамногалактуронаном I (RG-I) и рамногалактуронаном II (RG-II), реже апиогалактуронаном и ксилогалактуронаном (Оводов, 1998). Известно, что макромолекула пектинов, выделенных из разных растений, различается структурой линейной и разветвленной области (Оводова и др., 2000-2006).

Ранее было показано, что действие пектинов на воспаление зависит от строения линейной и разветвленной области их макромолекулы. Так, например, галактуронановый фрагмент макромолекулы комарумана CP ингибирует развитие воспаления (Porov *et al.*, 2005), а апиогалактуронан, фрагмент разветвленной области макромолекулы лемнана LM, оказывает противовоспалительное действие (Porov *et al.*, 2006).

Было установлено, что действие пектинов на функциональную активность лейкоцитов зависит от молекулярной массы пектиновой макромолекулы (Puhlmann *et al.*, 1992). Установлено, что пектины, обладающие противовоспалительным действием, имеют молекулярную массу свыше 100 кДа (Попов, 2002). В то же время показано, что фрагмент потамогетонана с молекулярной массой свыше 300 кДа оказывает противовоспалительное действие. Не исключено, что действие пектинов на воспаление связано с их молекулярной массой.

Связь между особенностями строения макромолекулы пектинов и их действием на воспаление кишечника не исследована.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ: выявить область макромолекулы пектинов, обуславливающую их противовоспалительную активность при кишечном воспалении у мышей.

Задачи исследования.

1. Выявить пектины, предотвращающие развитие воспаления в стенке толстой кишки у мышей.
2. Исследовать противовоспалительную активность линейной области макромолекулы пектинов.
3. Определить зависимость противовоспалительного действия пектинов от типа строения разветвленной области макромолекулы.
4. Оценить действие на воспаление пектиновых фрагментов, различающихся по молекулярной массе и моносахаридному составу.
5. Дать характеристику противовоспалительного действия пектинов при повреждении стенки толстой кишки у мышей, вызванного ректальным введением уксусной кислоты.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА РАБОТЫ.

В работе впервые исследована способность различных по структуре пектинов ингибировать развитие воспаления в стенке толстой кишки у мышей. Выявлены новые пектины, оказывающие противовоспалительное действие при химическом повреждении стенки толстой кишки у мышей. Установлено, что участки галактуронана обладают противовоспалительным действием. Показано, что противовоспалительная активность пектинов не зависит от молекулярной массы фрагментов пектинов и от типа строения разветвленной области их макромолекулы.

Впервые показано, что пектины с определенной структурой способны ингибировать развитие воспаления стенки кишки при однократном превентивном пероральном введении. Показано, что при этом снижается адгезия перитонеальных лейкоцитов и проницаемость стенки сосудов брюшной полости у мышей.

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ.

Полученные результаты могут быть использованы в технологии производства пектиновых препаратов с противовоспалительной активностью с перспективой их применения в качестве биологически активных добавок или лекарственных средств. Накопленные данные открывают возможность дать рекомендации об использовании растений, содержащих пектиновые полисахариды с изученным строением, в пищевой и фармакологической промышленности.

Результаты диссертационной работы расширяют представление о связи между физиологической активностью пектинов и их строением и могут быть использованы в курсе лекций для студентов биологических, химических и медицинских факультетов.

ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ.

1. Выявлено, что из пятнадцати исследованных пектинов (см. табл. 1, 2, стр. 6, 7) только комаруман СР, оксикоккусан ОР, пектин клюквы *Vaccinium oxycoccus* L., танацетан TVC, пектин пижмы обыкновенной *Tanacetum vulgare* L., раувольфиан RS и RSP, пектин раувольфии змеевидной *Rauwolfia serpentine* L. предотвращают развитие кишечного воспаления. Установлено, что эти пектины способны ингибировать развитие воспаления в стенке толстой кишки у мышей при однократном превентивном пероральном введении.
2. Противовоспалительное действие пектинов обусловлено галактуронановым фрагментом их макромолекулы. Галактуронан предотвращает повреждение стенки кишки независимо от противовоспалительной активности исходного пектина.
3. Показано, что противовоспалительным действием обладают слаборазветвленные фрагменты пектинов, основным составляющим элементом которых является галактуронан.
4. Противовоспалительным действием обладают только те пектины, которые блокируют привлечение нейтрофилов в стенку толстой кишки после ректального введения кислоты.

АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ. По результатам исследований были сделаны доклады на III Съезде биохимического общества (С.-Петербург, 2002); IV Молодежной научной

конференции: «Физиология человека и животных: от эксперимента к клинической практике» (Сыктывкар, 2004); IX Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых: «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2005); VIII Всероссийском конгрессе: «Оптимальное питание – здоровье нации» (Москва, 2005); Международном научно-медицинском форуме «Гастро-2006» (С.-Петербург, 2006); IV Всероссийской научной конференции: «Химия и технология растительных веществ» (Сыктывкар, 2006); II Международной научной конференции: «Химия, технология и медицинские аспекты природных соединений» (Алматы, Казахстан, 2007).

ПУБЛИКАЦИИ. По результатам диссертации опубликовано 10 научных работ, в том числе 4 статьи в журналах, рекомендуемых ВАК для публикации основных научных результатов диссертации на соискание ученой степени кандидата наук.

ОБЪЕМ И СТРУКТУРА ДИССЕРТАЦИИ. Диссертация изложена на 101 машинописной странице, состоит из введения, четырех глав (обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования, обсуждение результатов), выводов и списка литературы (180 источников). Диссертация содержит 5 таблиц и 21 рисунок.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Пектины из растительного сырья выделяли по ранее описанной методике (патент РФ №2149642). При получении линейного фрагмента макромолекулы пектинов использовали метод частичного кислотного гидролиза. Для гидролиза применяли трифторуксусную кислоту, поскольку она вызывает наименьшую деструкцию моносахаридов (York *et al.*, 1986). Данный метод основан на различной устойчивости гликозидных связей полисахаридов к действию кислот (Aspinall, 1982), что дает возможность получать из пектинов галактуронан, лишенный боковых углеводных цепей из остатков нейтральных моносахаридов (Thibault *et al.*, 1993).

Для получения гомогенных по молекулярной массе фракций пектинов проводили их последовательное разделение по молекулярной массе в ультрафильтрационной ячейке («Millipore», США) с помощью ультрафильтрационных мембран (полисульфон, «Владисарт», Россия) с различными размерами пор (300, 100 и 50 кДа). В результате были получены пектиновые фрагменты с молекулярными массами более 300 кДа, 100–300 кДа и 50–100 кДа.

Пектины и их фрагменты, использованные в работе, были получены в лаборатории биотехнологии и лаборатории гликологии Отдела молекулярной иммунологии и биотехнологии Института физиологии Коми НЦ УрО РАН. Образцы полисахаридов и их структурно-химическая характеристика получены и любезно предоставлены к.х.н. Оводовой Р.Г., к.х.н. Головченко В.В. и к.б.н. Гюнтер Е.А. Химическая характеристика исследованных пектинов представлена в Таблицах 1 и 2.

Исследования проводили на самцах и самках половозрелых белых лабораторных мышей массой тела 25–30 г., полученных из специализированного питомника «Рапполово» (ФГУП, РАМН). Водные растворы полисахаридов вводили перорально, в дозах от 50 до 200 мг/кг однократно утром натощак. Контрольные животные получали эквивалентный объем воды. Повреждение стенки толстой кишки индуцировали через 48 часов путем разового ректального введения 5%-ой уксусной кислоты (100 мкл). Кислоту вводили через пластиковый катетер на глубину 3 см проксимальней ануса (Iton *et al.*, 2000). В качестве сравнения использовали пектин яблочный и пектин цитрусовый (MP Biomedicals Inc.). Для положительного контроля использовали преднизолон. Через сутки после ректального введения кислоты мышей умерщвляли и изолировали фрагмент (5 см) толстой кишки проксимальней ануса. Определяли степень повреждения стенки толстой кишки (Mahgoub *et al.*, 2003). Площадь поражения выражали в процентах от площади фрагмента кишки.

Таблица 1

Общая химическая характеристика полисахаридов, использованных в работе

Источник выделения	Название	GalA, %	Нейтральные моносахариды, %						
			Gal	Ara	Rha	Api	Glc	Xyl	Man
Сабельник болотный <i>Comarum palustre</i> L., (наземная часть)	Комаруман СР*	64,0	13,0	6,0	12,0	-	-	-	-
Комаруман СР	Комаруман СРН*	96,0	3,5	-	1,5	-	-	-	-
Клюква четырёхлистная <i>Vaccinium oxycoccos</i> L. (шрот ягод)	Оксикоккусан ОР*	82,4	3,4	8,0	1,3	-	4,7	0,4	0,5
Брусника <i>Vaccinium vitis-idaea</i> L. (шрот ягод)	VV*	81,6	3,0	4,5	2,1	-	3,3	0,5	0,4
Бадан толстолистный <i>Bergenia crassifolia</i> (листья)	Бергенан ВС*	84,0	3,1	2,8	1,3	-	2,0	0,24	1,1
Ряска малая <i>Lemna minor</i> (листья)	Лемнан LM*	64,0	4,9	3,9	3,2	19,6	-	3,7	-
Лемнан LM	Лемнан LMH	98,9	-	-	-	-	-	-	-
Смолевка обыкновенная <i>Silene vulgaris</i> L. (стебель, листья)	Силенан SV*	63,0	3,2	4,2	2,2	-	2,7	1,9	1,1
Силенан SV	Силенан SVH	94,7	сл.	-	сл.	-	-	-	-
Каллус раувольфии змеевидной <i>Rauwolfia serpentina</i>	Раувольфиан RS*	51,0	6,8	7,1	2,6	-	31,3	0,5	0,7
	Раувольфиан RSP*	82,0	5,0	4,1	2,1	-	5,0	1,8	-
Каллус пижмы обыкновенной <i>Tanacetum vulgare</i>	Танацетан TVC**	68,0	4,4	5,2	1,5	-	1,4	1,1	0,4
Танацетан TVC	Танацетан TVC ₃₀₀ **	77,0	2,3	4,1	1,0	-	0,8	0,4	0,2
Танацетан TVC	Танацетан TVC ₅₀ **	2,0	1,2	2,1	0,4	-	2,2	1,6	1,0
Танацетан TVC	Танацетан TVCH	98,0	-	-	-	-	-	-	-
Каллус ряски малой <i>Lemna minor</i>	Лемнан LMC**	52,7	8,9	8,3	2,4	1,4	1,6	2,5	0,5
Лемнан LMC	Лемнан LMC ₃₀₀ **	69,6	4,4	10,5	0,5	1,0	0,4	1,1	0,2
Лемнан LMC	Лемнан LMC ₅₀ **	29,2	21,5	17,5	1,8	1,7	7,5	17,2	1,6
Лемнан LMC	Лемнан LMCH	97,0	-	-	-	-	-	-	-
Каллус смолевки татарской <i>Silene tatarica</i>	Силенан STC**	68,6	4,0	2,8	1,5	-	1,8	1,7	1,1
Силенан STC	Силенан STC ₃₀₀ **	65,5	5,3	4,0	2,1	-	1,3	0,8	0,9
Силенан STC	Силенан STC ₅₀ **	33,4	8,8	4,8	2,1	-	10,3	10,3	3,8

Источник выделения	Название	GalA, %	Нейтральные моносахариды, %						
			Gal	Ara	Rha	Api	Glc	Xyl	Man
Силенан STC	Силенан STCH	98,0	-	-	-	-	-	-	-
Пектин яблочный AP	MP Biomedicals Inc.	70,0	сл.	-	сл.	-	29,0	сл.	-
Пектин яблочный AP	APH	99,0	-	-	-	-	-	-	-
Пектин цитрусовый PC	MP Biomedicals Inc.	67,0	3,1	1,2	1,7	-	27,0	0,6	-

Примечание: GalA – галактуроновая кислота, Gal – галактоза, Ara – арабиноза, Rha – рамноза, Api – апиоза, Glc – глюкоза, Xyl – ксилоза, Man – манноза.

* – пектины выделены и охарактеризованы в Лаборатории гликологии ИФ Коми НЦ УрО РАН.

** – пектины выделены и охарактеризованы в Лаборатории биотехнологии ИФ Коми НЦ УрО РАН.

Таблица 2

Молекулярно-массовая характеристика пектиновых фрагментов

Пектины	Молекулярная масса пектиновых фрагментов, кДа	Содержание фрагментов в пектине, %
Комаруман CP	50-100	5,2
	100-300	8,7
	300-400	52,8
	>400	33,1
Раувольфиан RS	100-300	99,8
Лемнан LM	50-100	38,9
	100-300	57,6
	>400	3,4
Танацетан TVC	50-100	7,6
	>300	80,0
Лемнан LMC	50-100	7,6
	>300	65,0
Силенан STC	50-100	3,3
	>300	62,4
Зостеран ZM*	>300	74,0
	>400	24,5
Пектин яблочный AP	>400	99,5
Пектин цитрусовый PC	100-300	77,0
	>400	22,9

*Пектин морских трав сем. *Zosteraceae*: *Zostera marina* L. и др.

О степени инфильтрации стенки толстой кишки нейтрофилами судили по активности миелопероксидазы (МПО) – специфического фермента азурофильных гранул нейтрофилов (Krawisz *et al.*, 1984). Активность МПО в стенке кишки определяли спектрофотометрически по ранее описанной методике (Пинегин, 1995; Evans, 2000). Проницаемость стенки сосудов определяли в тесте с красителем Эванса (Bettina *et al.*, 2000). Количество кишечной слизи в толстой кишке оценивали по степени связывания красителя алцианового синего со слизистой кишечника (Blandizzi *et al.*, 1999). Определяли адгезию перитонеальных лейкоцитов у мышей (Fraser *et al.*, 1993).

При обработке данных вычисляли среднее арифметическое значение, среднее квадратичное отклонение. Достоверность различий оценивалась по *U*-критерию Манна-Уитни, с использованием программного обеспечения “Statistica 6.0” (Stat Soft. Inc).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выявление пектинов, защищающих стенку толстой кишки мышей от химически индуцированного повреждения.

Установлено, что только пять (CP, OP, RS, RSP и TVC) из 15 исследованных полисахаридов оказывают противовоспалительное действие при химическом поражении стенки толстой кишки у мышей. Противовоспалительное действие пектинов характеризуется снижением площади поражения более чем в два раза (рис. 1) и уменьшением степени повреждения на 40% (рис. 2). Активность МПО в стенке кишки мышей, получивших RS, OP, TVC и CP, уменьшается по сравнению с контролем в два раза (рис. 3). При этом комаруман, раувольфиан, танацетан и оксикоккусан обладают одинаковой степенью защитного действия, сравнимого с действием преднизолона, гормонального противовоспалительного препарата.

Установлено, что ряд пектинов оказывает действие только на отдельные параметры повреждения кишки. Так, например, алиуман AS, пектин выделенный из чеснока, снижает активность МПО в стенке кишки и уменьшает площадь поражения, но не действует на степень повреждения (рис. 1-3). Пектин из ягод брусники VV уменьшает степень и площадь поражения, но не действует на активность МПО в стенке кишки (рис. 1-3).

Обнаружено, что лемнан LM и силенан SV способствуют увеличению площади поражения стенки толстой кишки. Однако активность МПО и степень повреждения остаются на уровне, характерном для мышей, получавших до индукции воспаления воду.

Зостеран, бергенан, танацетан, пектин цитрусовый и пектин яблочный не оказывают действия на пораженные стенки кишки при химическом повреждении. Степень, площадь поражения и активность МПО в стенке толстой кишки у мышей получивших, эти пектины, сравнима с таковыми у контрольных мышей, получивших до индукции воспаления воду (рис. 1-3).

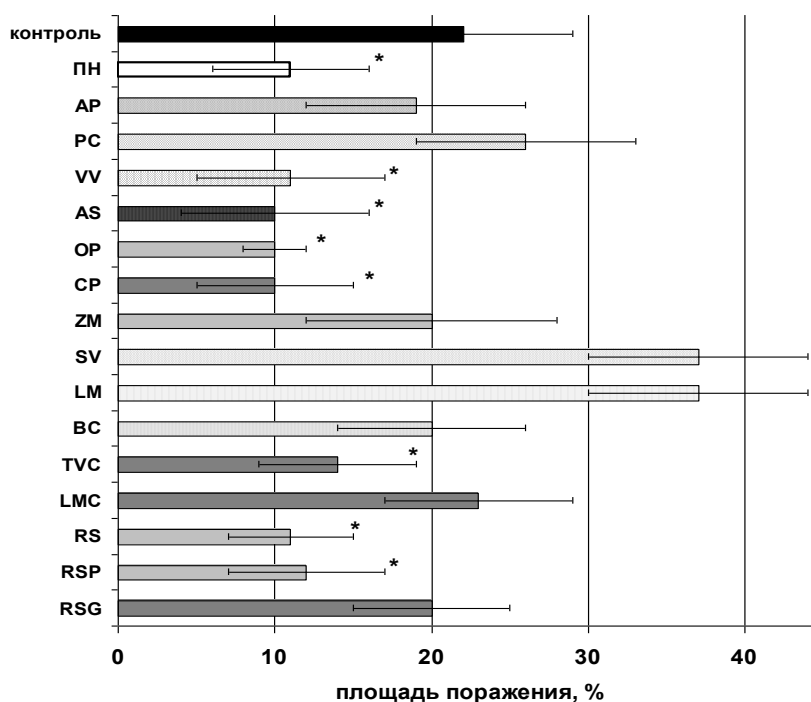


Рисунок 1. Площадь поражения стенки толстой кишки у мышей, получивших пектины (п/о 200 мг/кг) за 48 ч до ректального введения уксусной кислоты. Данные представлены в виде среднего арифметического значения \pm стандартное отклонение. Количество животных – 7. * – различия достоверны по сравнению с контролем при $p < 0,05$. ПН – преднизолон. Названия пектинов даны в Табл. 1, 2.

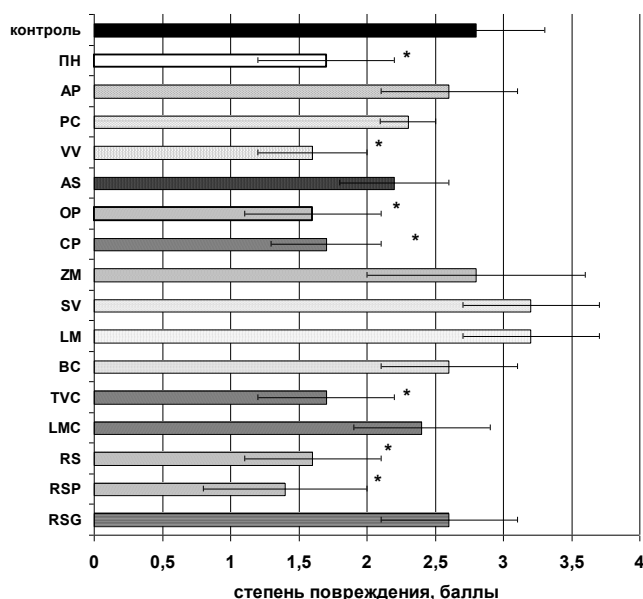


Рисунок 2. Степень поражения стенки толстой кишки у мышей, получивших пектины (п/о 200 мг/кг) за 48 ч до ректального введения уксусной кислоты. Данные представлены в виде среднего арифметического значения \pm стандартное отклонение. Количество животных – 7. * – различия достоверны по сравнению с контролем при $p < 0,05$. ПН – преднизолон. Названия пектинов даны в Табл. 1, 2.

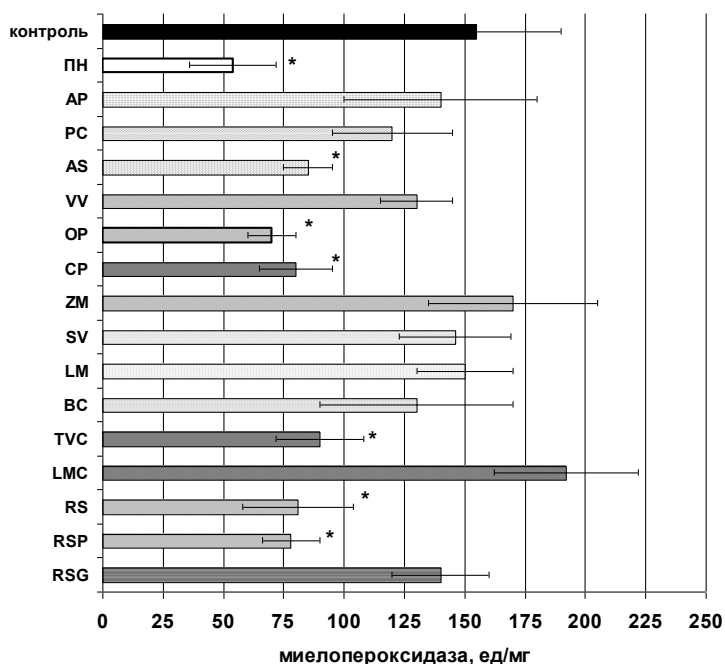


Рисунок 3. Активность МПО в стенке толстой кишки у мышей, получивших пектины (п/о 200 мг/кг) за 48 ч до ректального введения уксусной кислоты. Данные представлены в виде среднего арифметического значения \pm стандартное отклонение. Количество животных – 7. * – различия достоверны по сравнению с контролем при $p < 0,05$. ПН – преднизолон. Названия пектинов даны в Табл. 1, 2.

Таким образом, в результате скрининга выявлены пектины (CP, OP, RS, RSP и TVC), защищающие стенку толстой кишки от повреждающего действия уксусной кислоты. Из Рис. 3 видно, что противовоспалительное действие пектинов сопровождается

уменьшением количества нейтрофилов в кишечной стенке. Пектины оказывают противовоспалительное действие при условии их перорального введения в дозе 200 мг/кг за 48 ч до индукции кишечного воспаления.

Выявление сразу пяти новых пектинов с защитным действием стало возможно благодаря тому, что пектины, использованные нами, выделялись из разных видов растений (сабельник, ряска, смолевка, бадан, чеснок, брусника и клюква), а также из каллусных культур клеток растений (раувольфия и пижма). Тем самым были исследованы пектины с большим разнообразием структур, чем это делалось ранее другими исследователями.

Проведенные сравнения между типом строения разветвленной области макромолекулы пектинов и их действием на повреждение стенки кишки не выявили закономерностей. Сравнивали строение пектинов, предотвращающих (комаруман CP), не предотвращающих (бергенан BC, лемнан LMC), а также пектинов, вызывающих увеличение площади воспаления при химическом повреждении стенки кишки у мышей (лемнан LM и силенан SV).

Основная углеводная цепь пектинов представлена линейным 1,4- α -D-галактуронаном. Разветвленная область лемнана LM образована апиогалактуронаном (Ovodova *et al.*, 2000; Golovchenko *et al.*, 2002). В силенане (Ovodova *et al.*, 2000), комарумане CP (Ovodova *et al.*, 2005) и бергенане BC (Golovchenko *et al.*, 2007) разветвленная область макромолекулы образована рамногалактуронаном I (RG-I). Несмотря на однотипное строение разветвленной области макромолекулы этих пектинов, только комаруман CP предотвращает развитие повреждения стенки кишки. Строение разветвленной области макромолекул лемнана LM и силенана SV различно, однако оба пектина вызывают провоспалительную реакцию при химическом поражении стенки толстой кишки. Данные факты указывают на то, что противовоспалительное действие пектинов не связано с типом строения разветвленной области макромолекулы пектинов.

Исследуемые пектины состоят из фрагментов с разной молекулярной массой. Пектины различаются количественным содержанием высоко- и низкомолекулярных фракций. Основным составляющим большинства пектинов являются фрагменты с молекулярной массой более 100 кДа (табл. 2).

Как показали полученные результаты, действие пектинов на воспаление в стенке толстой кишки у мышей не связано с молекулярной массой пектиновых фрагментов. Так, например, комаруман CP, танацетан TVC, зостеран ZM, лемнан LMC и пектин яблочный AP более чем на 60- 80% состоят из полисахаридных фрагментов с молекулярной массой свыше 300 кДа. Предотвращают развитие кишечного воспаления только комаруман CP и танацетан TVC (рис. 1-3). Преобладающими фрагментами раувольфиана RS и лемнана LM являются полисахаридные цепи с Mw менее 300 кДа (табл. 2), однако действие этих пектинов на развитие воспаления различно (рис. 1-3). Следовательно, можно заключить, что противовоспалительная активность пектинов не связана с молекулярной массой составляющих их полисахаридных фрагментов и, по-видимому, определяется особенностями строения их макромолекулы.

Таким образом, установлено, что пектины CP, OP, RS, RSP и TVC защищают стенку толстой кишки от химически индуцированного воспаления при однократном пероральном введении. При этом противовоспалительным действием обладают не все пектины. Защитное действие пектинов на стенку кишечника не связано с типом строения разветвленной области пектинов и не зависит от молекулярной массы пектинов. Полученные данные согласуются с представлениями о том, что физиологическая активность пектинов зависит от особенностей их строения.

Влияние галактуронанового фрагмента пектинов на воспаление стенки толстой кишки у мышей.

Следующим этапом исследования было выявить структуру в макромолекуле пектинов, определяющую их защитное действие на стенку кишки. Исследовано действие галактуроновых фрагментов макромолекулы пектинов на индуцированное ректальным введением уксусной кислоты повреждение стенки толстой кишки у мышей.

Фрагменты линейной области макромолекулы пектинов были выделены из пектинов, обладающих: комаруман CP, раувольфиан RS, танацетан TVC, – и не обладающих: лемнан LM, силенан SV и пектин яблочный AP, – защитным действием на стенку кишки. Определена активность галактуроновых фрагментов: комарумана CPH, раувольфиана RSH, танацетана TVCH, лемнана LMH, силенана SVH и пектина яблочного APH, полученных при частичном кислотном гидролизе соответствующих пектинов.

Площадь поражения стенки кишки уменьшается более чем в два раза после перорального введения галактуроновых фрагментов макромолекулы пектинов (рис. 4). Степень повреждения (рис. 5) и активность МПО (рис. 6) в стенке толстой кишки снижаются более чем на 50% у мышей, получивших галактуронан, по сравнению с животными, получившими воду.

Таким образом, установлено, что защитное действие пектинов при повреждении стенки толстой кишки мышей обусловлено галактуронаном – линейной областью макромолекулы пектинов или ее фрагментом. Противовоспалительное действие свойственно всем галактуронанам, независимо от противовоспалительной активности исходных пектинов.

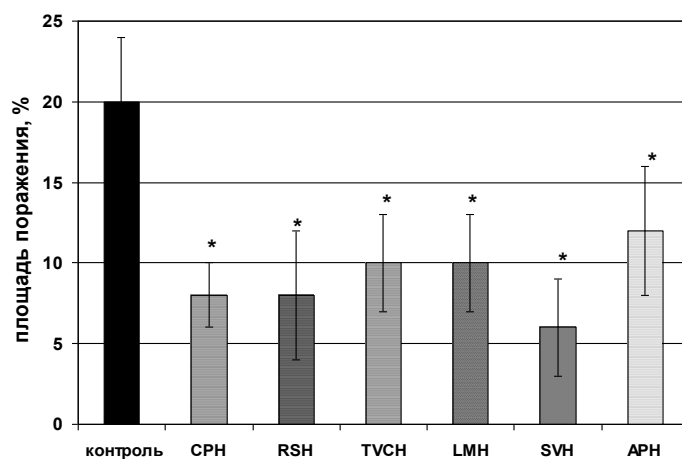


Рисунок 4. Площадь поражения стенки кишки у мышей, получивших галактуроновые фрагменты макромолекулы пектинов (п/о 200 мг/кг) за 48 ч до ректального введения уксусной кислоты. Данные представлены в виде среднего арифметического значения \pm стандартное отклонение. Количество животных – 7. * - различия достоверны по сравнению с контролем при $p < 0,05$.

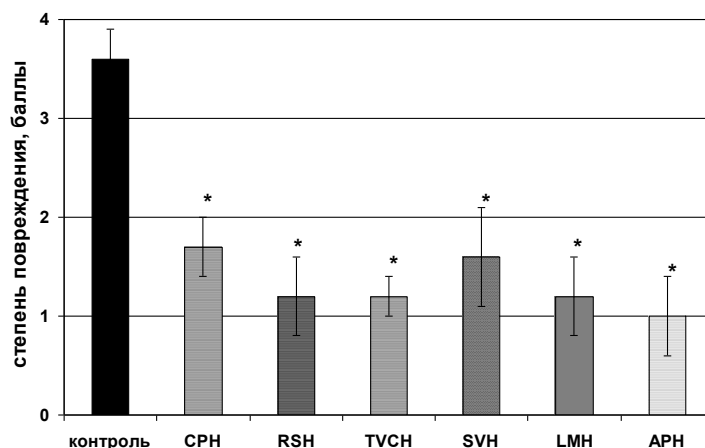


Рисунок 5. Степень повреждения стенки кишки у мышей, получивших галактуроновые фрагменты макромолекулы пектинов (п/о 200 мг/кг) за 48 ч до ректального введения уксусной кислоты.

Данные представлены в виде среднего арифметического значения \pm стандартное отклонение. Количество животных – 7. * - различия достоверны по сравнению с контролем при $p < 0,05$.

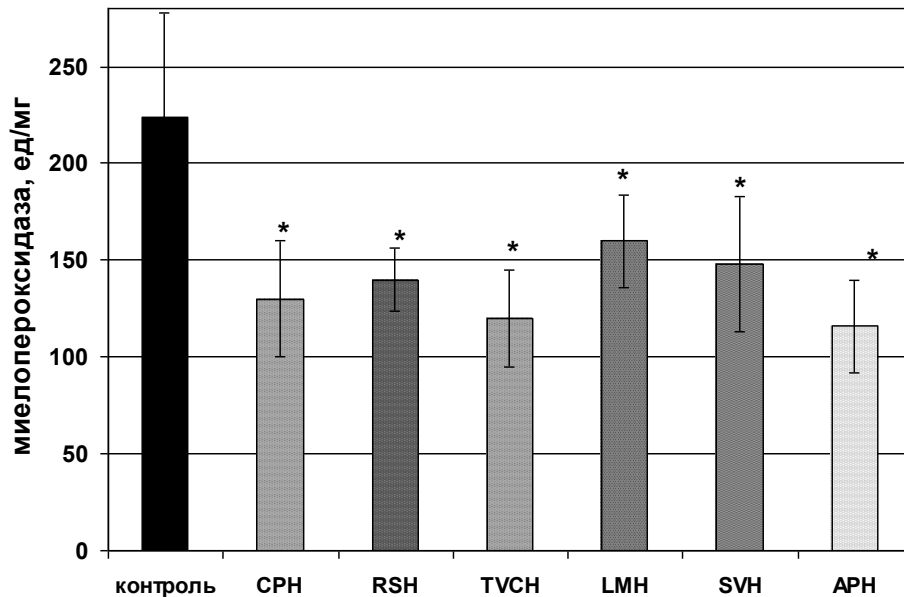


Рисунок 6. Активность МПО в стенке толстой кишки у мышей, получивших галактуроновый фрагмент пектинов (п/о 200 мг/кг) за 48 ч до ректального введения уксусной кислоты. Данные представлены в виде среднего арифметического значения \pm стандартное отклонение. Количество животных – 7. * - различия достоверны по сравнению с контролем при $p < 0,05$.

Влияние молекулярной массы пектиновых фрагментов на проницаемость стенки сосудов.

Как и другие исследованные пектины, танацетан TVC, лемнан LMC и силенан STC состоят из полимергомологов с различной молекулярной массой. Преобладающими являются фракции с молекулярной массой свыше 300 кДа: TVC₃₀₀, LMC₃₀₀, STC₃₀₀ (табл. 2). Основным составляющим элементом TVC₃₀₀, LMC₃₀₀, STC₃₀₀ являются остатки галактуроновой кислоты, около 70% (табл.1). Остатки нейтральных моносахаридов присутствуют в значительно меньших количествах. У полимергомологов танацетана TVC, лемнана LMC и силенана STC с молекулярной массой 50-100 кДа (TVC₅₀, LMC₅₀, STC₅₀) количественное соотношение остатков галактуроновой кислоты и остатков нейтральных моносахаридов примерно одинаково или преобладающими являются остатки нейтральных моносахаридов (табл. 1).

Зная, что остатки галактуроновой кислоты входят в состав галактуронана, линейной области макромолекулы пектинов, а остатки нейтральных моносахаридов образуют боковые цепи разветвленной области, можно предположить, что танацетан TVC₃₀₀, лемнан LMC₃₀₀ и силенан STC₃₀₀ являются слабо разветвленными пектинами, в которых основным структурным элементом макромолекулы является галактуронан. У фракции танацетана TVC, лемнана LMC и силенана STC с более низкой молекулярной массой преобладающим элементом структуры является разветвленная область макромолекулы, благодаря составу и разветвленности которой и наблюдаются существенные различия в структуре и свойствах вышеуказанных пектиновых полисахаридов.

Противовоспалительную активность пектинов оценивали по их действию на проницаемость стенки сосудов у мышей. Исследована проницаемость стенки сосудов у мышей после перорального введения танацетана TVC, лемнана LMC и силенана STC. Установлено, что только танацетан TVC обладает противовоспалительным действием.

Через сутки после перорального введения TVC проницаемость стенки сосудов снижается почти в два раза. Действие TVC на состояние стенки сосудов сравнимо с действием индометацина (рис. 7).

Определена противовоспалительная активность различных фракций пектинов. Установлено, что после перорального введения танацетана TVC₃₀₀, лемнана LMC₃₀₀ и силенана STC₃₀₀ проницаемость стенки сосудов в ответ на раздражитель не увеличивается (рис. 8), фрагменты пектинов TVC₅₀, LMC₅₀, STC₅₀ не оказывают влияния на проницаемость стенки сосудов (рис. 9).

На основе полученных результатов можно сделать вывод, что противовоспалительным действием обладают слаборазветвленные пектиновые полисахариды. Пектины, в макромолекуле которых преобладающим элементом структуры является разветвленная область, не оказывают противовоспалительного действия.

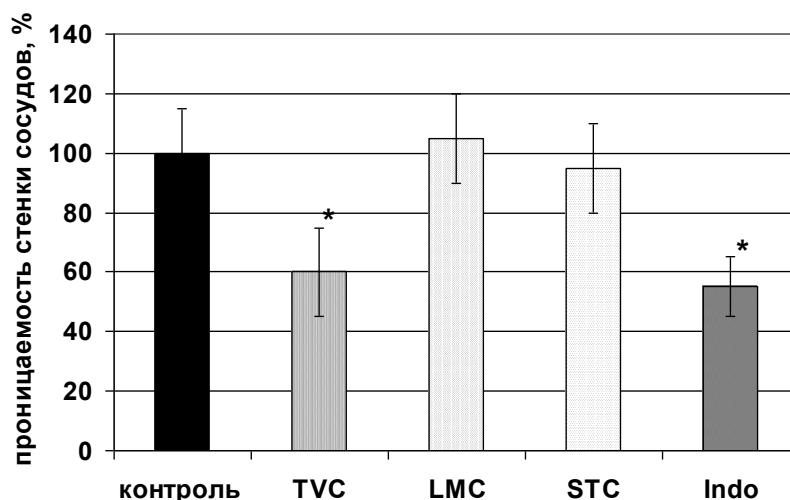


Рисунок 7. Проницаемость стенки сосудов у мышей через 24 ч после перорального введения танацетана TVC, лемнана LMC и силенана STC. Данные представлены в виде среднего арифметического значения \pm стандартное отклонение. Количество животных – 7. * – различия достоверны по сравнению с контролем при $p < 0,05$.

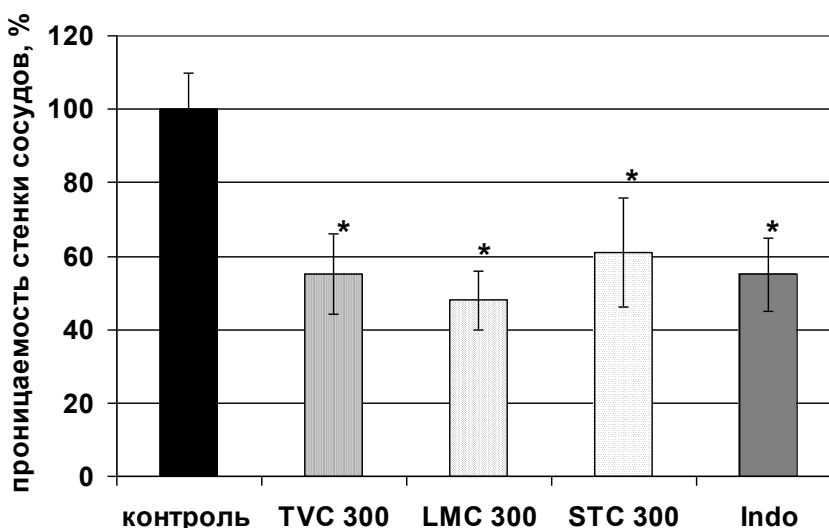


Рисунок 8. Проницаемость стенки сосудов у мышей через 24 ч после перорального введения танацетана TVC₃₀₀, лемнана LMC₃₀₀ и силенана STC₃₀₀. Данные представлены в виде среднего арифметического значения \pm стандартное отклонение. Количество животных – 7. * – различия достоверны по сравнению с контролем при $p < 0,05$.

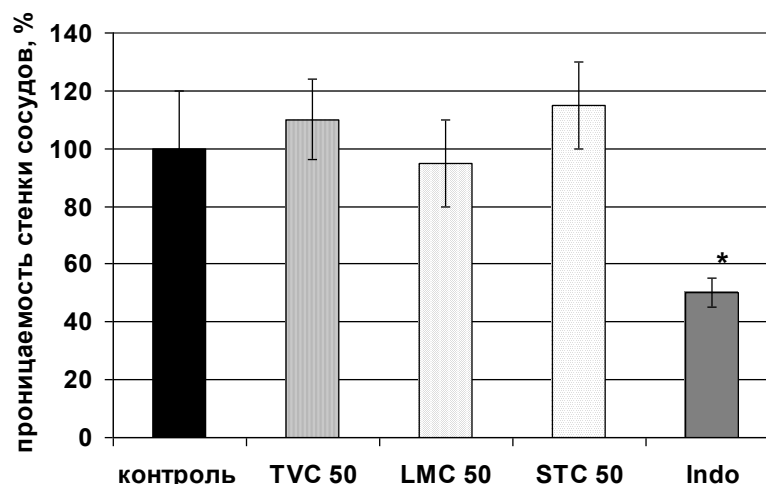


Рисунок 9. Проницаемость стенки сосудов у мышей через 24 ч после перорального введения танацетана TVC₅₀, лемнана LMC₅₀ и силенана STC₅₀. Данные представлены в виде среднего арифметического значения \pm стандартное отклонение. Количество животных – 7. * – различия достоверны по сравнению с контролем при $p < 0,05$.

Общим для TVC₃₀₀, STC₃₀₀ и LMC₃₀₀ является высокое содержание остатков галактуроновой кислоты (табл. 1). Что указывает на то, что противовоспалительное действие пектинов обусловлено именно галактуроновым фрагментом пектиновой макромолекулы. В этой связи было исследовано действие галактуроновых фрагментов макромолекулы пектинов, выделенных из танацетана TVC, лемнана LMC и силенана STC.

Установлено, что через 24 ч после перорального введения галактуронового фрагмента макромолекул танацетана TVCH, силенана STCH и лемнана LMCH проницаемость стенки сосудов снижается более чем в два раза (рис. 10). Полученные данные подтверждают, что противовоспалительная активность пектинов обусловлена галактуроновым фрагментом их макромолекулы.

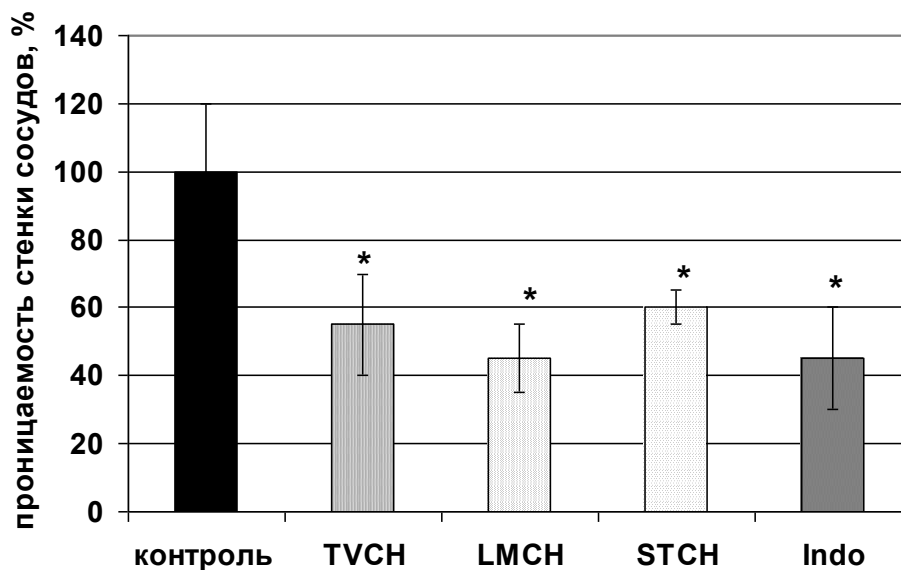


Рисунок 10. Проницаемость стенки сосудов у мышей через 24 ч после перорального введения танацетана TVCH, лемнана LMCH и силенана STCH. Данные представлены в виде среднего арифметического значения \pm стандартное отклонение. Количество животных – 7. * – различия достоверны по сравнению с контролем при $p < 0,05$.

Характеристика противовоспалительной активности пектинов.

Ранее уже сообщалось (Rolandelli *et al.*, 1988; Lim *et al.*, 2003) о двух коммерческих пектинах: яблочном и цитрусовом, - которые ингибируют воспаление стенки толстой кишки. Противовоспалительное действие пектинов проявляется при их добавлении в рацион питания крысам в виде 1%-ного или 2%-ного водного раствора на протяжении 7-10 дней.

Отличием полученных данных от результатов других исследователей является то, что пектины, обладающие противовоспалительным действием, вводились однократно в дозе 200 мг/кг за 48 ч до индукции воспаления. Использование однократного перорального введения пектинов позволило снизить вероятность влияния на результат короткоцепочечных жирных кислот (КЦЖК), образующихся при ферментации полисахаридов микрофлорой кишечника (Titgemeyer *et al.*, 1991). Известно, что КЦЖК снижают функциональную активность нейтрофилов (Eftimiadi *et al.*, 1987) и тем самым могут оказывать влияние на развитие воспаления.

Известно, что в развитии кишечного воспаления значительную роль играют привлеченные нейтрофилы (Nusrat *et al.*, 1997). После выхода из кровотока в ткань нейтрофилы секретируют активные формы кислорода, разрушающие клеточные структуры стенки кишки (Pravda, 2005).

Уменьшение активности МПО в стенке кишки после ректального введения кислоты говорит о том, что противовоспалительное действие пектинов связано с уменьшением количества привлеченных нейтрофилов. В связи с этим, исследовано влияние пектинов, обладающих противовоспалительным действием, на адгезию лейкоцитов и проницаемость стенки сосудов как основные факторы, определяющие интенсивность миграции лейкоцитов к очагу воспаления. Кроме того, снижение миграции нейтрофилов в стенку кишки может быть обусловлено увеличением количества кишечной слизи.

Оценку функционального состояния перитонеальных лейкоцитов, проницаемость стенки сосудов органов брюшной полости и количество кишечной слизи в толстой кишке у мышей проводили через 48 ч после перорального введения пектинов.

Установлено, что комаруман СР и оксикоккусан ОР, при пероральном введении, снижают адгезию лейкоцитов брюшной полости и проницаемость стенки сосудов (рис. 11, 12).

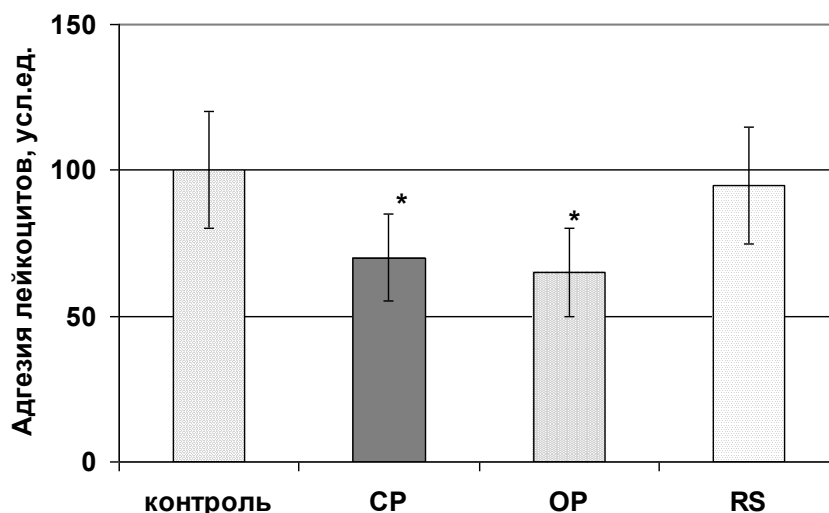


Рисунок 11. Адгезия перитонеальных лейкоцитов у мышей через 48 ч после перорального введения пектинов. Данные представлены в % к контролю, принятому за 100%. Количество животных – 7. * – различия достоверны по сравнению с контролем при $p < 0,05$.

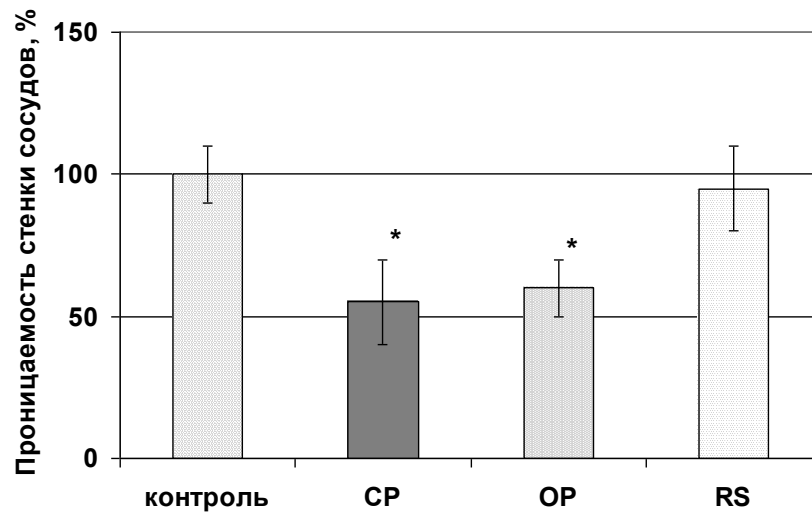


Рисунок 12. Проницаемость стенки сосудов у мышей через 48 ч после перорального введения пектинов. Данные представлены в % к контролю, принятому за 100%. Количество животных – 7. * – различия достоверны по сравнению с контролем при $p < 0,05$.

Установлено, что количество кишечной слизи увеличивается под действием комарумана CP и не изменяется при введении раувольфиана RS и оксикоккусана OP (рис. 13).

Пока не известно, с чем связана способность комарумана увеличивать количество кишечной слизи. Не исключено, что это обусловлено разветвлением галактуронанового кора комарумана, поскольку данная структурная особенность приводит к образованию макромолекулярной сетки, способной удерживать большое количество слизи. Из Рис. 13 видно, что только комаруман обладает таким свойством, в то время как оксикоккусан OP и раувольфиан RS лишены данной способности.

Действие пектинов на функциональное состояние лейкоцитов и проницаемость стенки сосудов может быть вызвано изменением цитокинового баланса. Ранее было показано, что пероральное введение пектина, выделенного из рдеста плавающего *Potamogeton natans* L., увеличивает уровень ИЛ-10 – противовоспалительного цитокина (Роров *et al.*, 2007). Известно, что ИЛ-10 способен ингибировать не только адгезивность нейтрофилов (Vora *et al.*, 1996; Berlato *et al.*, 2002), но и секреторную активность тучных клеток и предотвращать тем самым выброс вазоактивных медиаторов воспаления (Thompson-Snipes *et al.*, 1991).

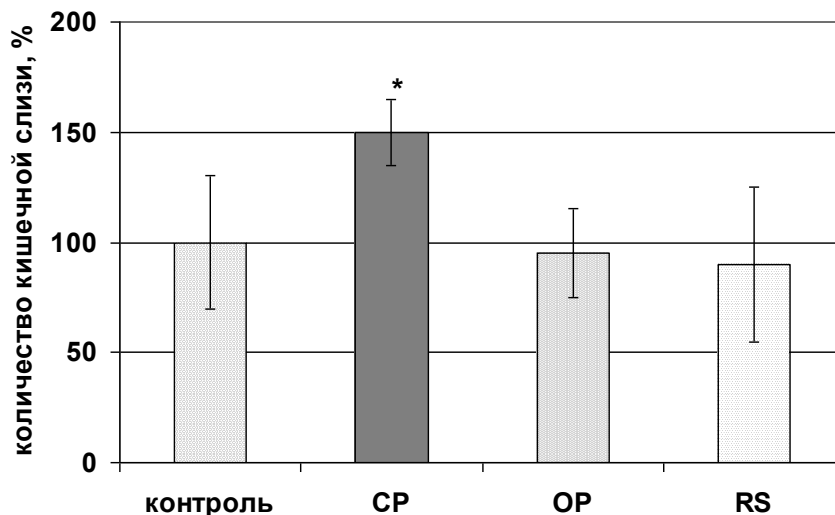


Рисунок 13. Количество кишечной слизи на стенке толстой кишки у мышей через 48 ч после перорального введения пектинов. Данные представлены в % к контролю, принятому за 100%. Количество животных – 7. * – различия достоверны по сравнению с контролем при $p < 0,05$.

Из Рис. 11, 12 можно видеть, что в отличие от комарумана СР и оксикоккусана ОР, противовоспалительное действие раувольфиана RS не сопровождается изменением адгезии нейтрофилов и проницаемости стенки сосудов. Возможно, что действие раувольфиана RS на воспаление в стенке кишки связано с иными механизмами, например, с его антиоксидантными свойствами. Ранее было показано, что флавоноловый глюкозид рутин ингибирует развитие кишечного воспаления (Galvez *et al.*, 1997); предполагается, что его противовоспалительное действие связано с ингибированием активных форм кислорода, секретируемых нейтрофилами.

Таким образом, установлено, что пектины комаруман СР и оксикоккусан ОР уменьшают адгезию лейкоцитов и снижают проницаемость стенки сосудов.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что ингибирующим действием на воспаление стенки толстой кишки у мышей, при однократном пероральном введении, обладают лишь отдельные пектиновые полисахариды, что указывает на связь их противовоспалительной активности со структурой макромолекулы.
2. Показано, что противовоспалительное действие пектиновых полисахаридов обусловлено их главной углеводной цепью - галактуронановым кором макромолекулы.
3. Найдено, что галактуронан ингибирует развитие воспаления стенки толстой кишки независимо от противовоспалительной активности исходного пектина.
4. Сравнение пектинов с различной структурой разветвленной области указывает на отсутствие существенного влияния данной области макромолекулы на противовоспалительную активность пектинов.
5. Впервые обнаружено, что комаруман СР, оксикоккусан ОР, танацетан TVC, обладают способностью уменьшать проницаемость стенки сосудов брюшной полости, что может препятствовать развитию воспаления. Действие на проницаемость стенки сосудов танацетана TVC обусловлено входящими в его состав полисахаридными цепями с молекулярной массой свыше 300 кДа.
6. Установлено, что пектины обладают профилактическим противовоспалительным действием, которое сопровождается уменьшением количества нейтрофилов в очаге воспаления и снижением адгезии перитонеальных лейкоцитов.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Popov S.V. Protective effect of Comaruman, pectin of cinquefoil *Comarum Palustre* L., on acetic acid induced colitis in mice / S.V. Popov, R.G. Ovodova, **P.A. Markov**, I.R. Nikitina, Yu. S. Ovodov // Dig. Dis. Sci. -2006. -Vol.51. - P.1532-1537.
2. Popov S.V. Adjuvant effect of lemnian, pectic polysaccharides of callus culture of *Lemna minor* L. at oral administration / S.V. Popov, E.A. Gunter, **P.A. Markov**, V.V. Smirnov, D.S. Khramova, Yu. S. Ovodov // Immunopharmacol. Immunotoxicol. -2006. -Vol.28. -P. 141 – 152.
3. Popov S.V. Preventive effect of a pectic polysaccharide of the common cranberry *Vaccinium oxycoccos* L. on acetic acid-induced colitis in mice / S.V. Popov, **P.A. Markov**, I.R. Nikitina, S.V. Petrishev, V.V. Smirnov, Yu. S. Ovodov // World J. Gastroenterol. -2006. -Vol.41. -P. 6646-6651.

4. Попов С.В. Химическая характеристика и противовоспалительное действие раувольфиана, пектинового полисахарида каллуса раувольфии змеиной / С.В. Попов, В.Г. Винтер, О.А. Патова, **П.А. Марков**, И.Р. Никитина, Р.Г. Оводова, Г.Ю. Попова, А.С. Шашков, Ю.С. Оводов // Биохимия (Москва). -2007. -Том. 72. -С. 778-784.
5. **Марков П.А.** Влияние пектинов на количество нейтрофилов в стенке верхних отделов тонкой кишки мышей / **П.А. Марков** // Тр. Коми НЦ УрО РАН. -2005. -№176. -С.75-86.
6. **Марков П.А.** Пектины смолевки и ряски стимулируют фагоциты, не вызывая воспаления кишечника / **П.А. Марков**, О.А. Бушнева, В.В. Головченко, И.Р. Никитина, Р.Г. Оводова, С.В. Попов, Ю.С. Оводов // Тез. III Съезда биохим. общ-ва Санкт-Петербурга. -2002. -С. 263.
7. **Марков П.А.** Действие раувольфиана, пектина из раувольфии змеевидной (*Rauwolfia serpentina*) на развитие язвенного колита у мышей / **П.А. Марков**, Р.Г. Оводова, И.Р. Никитина, Ю.С. Оводов // Тез. IV Всерос. конф. «Химия и технология растительных веществ» Сыктывкар, 2006. -С. 306.
8. **Марков П.А.** Комаруман пектин из сабельника болотного (*Comarum palustre* L.) предотвращает развитие экспериментального кишечного воспаления / **П.А. Марков**, С.В. Попов, Р.Г. Оводова, И.Р. Никитина // Мат. 8-го Межд. Славяно-Балтийского научного форума "Санкт-Петербург – Гастро-2006. «Гастроэнтерология Санкт-Петербурга», 2006. -№ 1-2. -С.93.
9. **Markov P.A.** Effect of galacturonan fragments of pectins on colon inflammation in mice / **P.A. Markov**, I.R. Nikitina, R.G. Ovodova // Abstr. 14-th Carbohydr. Symp., Lubeck, Germany, 2007. -P. 496.
10. **Марков П.А.** Защитное действие пектинов на стенку толстой кишки мышей / **П.А. Марков**, И.Р. Никитина, Р.Г. Оводова // Тез. II Межд. Науч. Конф. «Химия, технология и медицинские аспекты природных соединений» (Алматы, Казахстан), 2007. -С. 118.

Выражаю искреннюю благодарность своим научным руководителям академику Юрию Семеновичу Оводову и к.б.н., доц. Сергею Владимировичу Попову за ценные советы и консультации. Благодарю сотрудников Отдела молекулярной иммунологии и биотехнологии Института физиологии Коми НЦ УрО РАН: Никитину И.Р. за помощь в выполнении анализов и проведение экспериментов; к.х.н., ст.н.с. Оводову Р.Г., к.б.н., доцента Гюнтер Е.А. и к.х.н., доцента Головченко В.В. за предоставленные и охарактеризованные образцы растительных полисахаридов.

Просьба отзывы отправлять по факсу:

Отдел аспирантуры Казанского университета: (843) 238-76-01.

или на e-mail: marpa@physiol.komisc.ru